家蝇气味结合蛋白基因 cDNA 片段的克隆与序列分析

朱彬彬[1,2]，姜 勇[1]，牛长缨[1]，周兴苗[1]，雷朝亮[1*]
（1. 华中农业大学昆虫资源研究所，武汉 430070；2. 宜昌市疾病预防控制中心，湖北宜昌 443000）

摘要：根据同源性设计特异性引物，采用 RT-PCR 方法扩增出了家蝇 *Musca domestica* 2 种气味结合蛋白基因 cDNA 片段，大小分别为 381 bp 和 353 bp，分别命名为 MdomOBP1（GenBank 登录号：AY730350）和 MdomOBP2（GenBank 登录号：AY730351）。测序分析结果表明，它们具有气味结合蛋白的标志性结构域。对这 2 个片段推导的氨基酸序列进行同源性分析，结果表明两者与已报道的双翅目昆虫的气味结合蛋白的同源性分别达 57% ~ 88% 和 52% ~ 91%。

关键词：家蝇；触角；气味结合蛋白；基因；克隆；序列分析
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)05-0804-06

Cloning and analysis of cDNA fragments of two odorant binding proteins from the antenna of *Musca domestica*

ZHU Bin-Bin[1,2]，JIANG Yong[1]，NIU Chang-Ying[1]，ZHOU Xing-Miao[1]，LEI Chao-Liang[1*]（1. Institute of Insect Resources，Huazhong Agricultural University，Wuhan 430070，China；2. Yichang Center for Disease Control and Prevention，Yichang，Hubei 443000，China）

Abstract：Two cDNA fragments of two different odorant binding protein（OBP）genes in *Musca domestica* were amplified with two pairs of specific primers by RT-PCR，and the lengths of them were 381 bp named MdomOBP1（GenBank accession no.：AY730350）and 353 bp named MdomOBP2（GenBank accession no.：AY730351）respectively. Sequencing and analysis showed that these two OBP cDNA fragments were characterized by typical conservative Cys. Deduced amino acid sequences were highly similar to that of six OBPs from Diptera，with sequence identities of 57% - 88% for MdomOBP1 and 52% - 91% for MdomOBP2.

Key words：*Musca domestica*；antenna；odorant binding protein；gene；cloning；sequence analysis

家蝇 *Musca domestica* 能够传播多种疾病的病原菌，影响人类的健康。家蝇还骚扰人类的休息，给人们的心理造成不良的影响，对旅游业、饮食业、娱乐业乃至医院产生负面的影响（雷朝亮，1998）。

灵敏的嗅觉对于昆虫的正常生存和适应环境具有重要的作用。昆虫感受到的气味物质多为脂溶性的小分子化合物，外界亲脂性分子不能直接穿过亲水性的触角感器淋巴液到达嗅觉神经树突末梢，而气味结合蛋白（odorant binding protein，OBP）则起到溶解并运输脂溶性气味化合物穿过亲水性液体的作用。研究发现，根据识别的气味分子不同，气味结合蛋白分为 2 大类：一类是信息素结合蛋白（pheromone binding protein，PBP），与昆虫感受性信息素有关（Vogt and Riddiford，1981；Vogt and Lerner，1989；Steinbretcht *et al*.，1992）；另一类是普通气味结合蛋白（general odorant binding protein，GOBP），包括 GOBP1 和 GOBP2。昆虫触角气味结合蛋白是一类水溶性的酸性蛋白，多肽链全长约 120 ~ 160 个氨基酸，相对分子量较小，一般为 13 ~ 17 kD，N 末端有一段 20 个氨基酸左右的信号肽（Pelosi and Maida，1995），序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点（Du and Prestwich，1995），这是鉴定经典气味结合蛋白的标志。

目前，国外已从鳞翅目昆虫如欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Vogt *et al*.，1991a）、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（Krieger *et al*.，1993）、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（Callahan *et al*.，2000）、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（Seabrook *et al*.，1987）、烟草天蛾

基金项目：湖北省自然科学基金项目(2001ABB128)
作者简介：朱彬彬，女，1980 年生，湖北当阳人，硕士研究生，主要从事昆虫分子生物学研究，E-mail：binbin2339@webmail.hzau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：ioir@mail.hzau.edu.cn
收稿日期 Received：2004-09-14；接受日期 Accepted：2004-12-06

Manduca sexta（Vogt *et al*.，1991b）、柞蚕 *Antheraea pernyi*（Breer *et al*.，1990），双翅目昆虫如果蝇 *Drosophila melanogaster*（Zhou *et al*.，2004）、尖音库蚊 *Culex pipiens*（Ishida *et al*.，2002）以及其他目的多种昆虫中克隆出了气味结合蛋白基因。国内也有克隆甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* GOBP2 基因（王桂荣等，2001）和冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因（李正西和 Zhou，2004）的报道。但是尚未见家蝇气味结合蛋白基因或其基因片段克隆的报道。

研究家蝇的嗅觉机制，作为家蝇可持续治理的一个有力措施，具有潜在价值。同时，家蝇气味结合蛋白的研究，为破解生物气味世界的秘密提供参考资料，具有重要的理论意义。

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

家蝇由本研究所用人工饲料饲养，羽化后 6~8 天内剪下触角，立即放在液氮中冷冻，然后置于 -70℃保存备用。

1.2　主要试剂

总 RNA 纯化试剂盒（TRIzol Reagent）为 Invitrogen Life Technologies 产品；DNA 胶回收试剂盒（Extraction Gel Kit）为中科开瑞公司产品；Taq 酶、dNTP 为晶美公司产品；M-MLV 反转录酶、pGEM-T 载体为 Promega 公司产品。

1.3　实验方法

1.3.1　总 RNA 提取：按照总 RNA 纯化试剂盒用户手册进行。

1.3.2　引物序列：参照已知的果蝇气味结合蛋白基因的保守序列设计 2 对特异性引物。引物对 Ⅰ 为

P1：5′-CGGCGTGTCAGTGCGTCT-3′；

P2：5′-GTGGCACAGCGTATCGCC-3′。

引物对 Ⅱ 为

P1：5′-ATGATTGGCTGTGCCGCT-3′；

P2：5′-TGGAACCACCAGGCTTTG-3′。

1.3.3　第 1 链 cDNA 合成：按照试剂盒用户手册进行。

1.3.4　PCR 扩增 cDNA 片段：PCR 反应总体积为 20 μL：2 μL 10×缓冲液，1 μL Mg^{2+}（50 μmol/L），各 0.5 μL 正反引物（5 μmol/L），2 μL dNTP 混合液（2 mmol/L），2 μL 模板 cDNA，11.5 μL 超纯水，1 U Taq 酶。

引物对 Ⅰ 的扩增条件：94℃预变性 3 min，94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 60 s。循环 30 次，然后 72℃延伸 10 min。引物对 Ⅱ 的扩增条件：退火温度为 56℃，其他条件与引物对 Ⅰ 的扩增条件一致。

1.3.5　PCR 产物克隆与测序：通过琼脂糖电泳分离目的基因片段，并回收纯化。PCR 产物纯化按照 DNA 胶回收试剂盒的用户手册进行，纯化后的片段克隆于 pGEM-T 载体上，由上海华诺生物公司测序。

1.3.6　序列分析：用 ORF Finder 和 ExPasy 对克隆片段进行翻译，用 Blast 和 Clustal W 软件进行同源性比较分析。

2　结果与分析

2.1　家蝇气味结合蛋白基因 cDNA 片段序列及推导的氨基酸序列

用引物对 Ⅰ 进行 RT-PCR，扩增出了与预期大小相符的 cDNA 片段 MdomOBP1（图 1）。将得到的靶片段克隆到 pGEM-T 载体中，通过标准蓝白斑筛选步骤和酶切检测，将阳性克隆进行测序，得到了长度为 381 bp 的核苷酸序列，推导出的氨基酸残基数为 127 个（图 2）。用引物对 Ⅱ 进行 RT-PCR，扩增出了与预期大小相符的 cDNA 片段 MdomOBP2（图 1）。将得到的靶片段克隆到 pGEM-T 载体中，通过蓝白斑筛选步骤和酶切检测，对阳性克隆进行测序，得到了长度为 353 bp 的核苷酸序列，根据这一序列推导出了 117 个氨基酸残基序列（图 3）。本实验通过以上 2 次 RT-PCR，得到了一个 381 bp 的气味结合蛋白 cDNA 序列（MdomOBP1，GenBank 登录号为 AY730350）和一个 353 bp 的气味结合蛋白 cDNA 序列（MdomOBP2，GenBank 登录号为 AY730351），分别推导出了一个 127 个和一个 117 个氨基酸的序列。

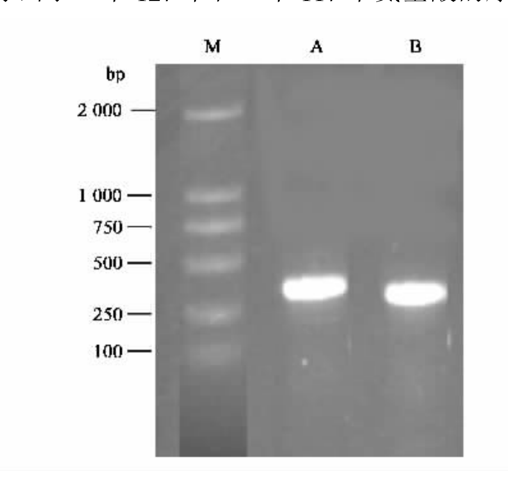


图 1　家蝇气味结合蛋白基因 PCR 扩增产物

Fig. 1　PCR product of odorant binding proteins in *Musca domestica*

M：标准分子量 Molecular weight marker（DL2000）；A：MdomOBP1（381 bp）；B：MdomOBP2（353 bp）.

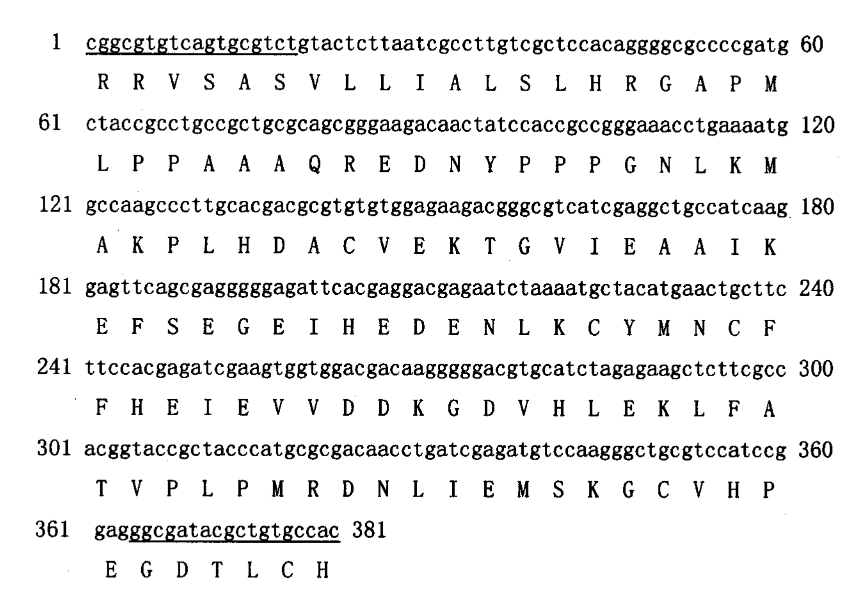


图 2 家蝇 cDNA 片段 MdomOBP1 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The OBP cDNA fragment MdomOBP1 and deduced amino acid sequence cloned from *Musca domestica*

加下划线的为引物序列 The underlined sequence represents primers. 下同 The same below.

1 atgattggctgtgccgctgcacacgatcctaggagcgatggcgaatggcctccgccagcg 60
M I G C A A A H D P R S D G E W P P P A
61 attctccacctgggcaaccacttccacgacatttgtgctccaaatactggtgttactgat 120
I L H L G N H F H D I C A P N T G V T D
121 gaagccatcaaagagttcagcgaggggcaaattcacgaggatgaggctctcaagtgctat 180
E A I K E F S E G Q I H E D E A L K C Y
181 tgaactgcctcttccacgatttcgaggtggtcgacgaccgcggggatgtccacatggag 240
M N C L F H D F E V V D D R G D V H M E
241 aaggtgttaaacgccattccaggagaaaagctgaggaacattatgatggaggcttccaag 300
K V L N A I P G E K L R N I M M E A S K
301 ggatgcattcatcctgagggcgacaccctgtgccacaaagcctggtggttcca 353
G C I H P E G D T L C H K A W W F

图 3 家蝇 cDNA 片段 MdomOBP2 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The OBP cDNA fragment MdomOBP2 and deduced amino acid sequence cloned from *Musca domestica*

2.2 同源性比较

分别将根据 MdomOBP1 和 MdomOBP2 推导出的 2 个氨基酸序列与已报道的其他 6 种双翅目昆虫的气味结合蛋白进行同源性分析，结果见图 4 和图 5。2 个推导的氨基酸序列与它们同源性都较高：同源性分别为 57% ~ 88% 和 52% ~ 91%。核苷酸序列的同源性更高，分别为 74% ~ 92% 和 76% ~ 91%（表 1）。同源性和相似性分析结果表明，本实验所得到的 381 bp 和 353 bp 的 cDNA 序列很可能是编码家蝇气味结合蛋白的部分核苷酸序列。

3 讨论

本研究结果表明，家蝇 2 个气味结合蛋白基因 cDNA 片段 MdomOBP1 和 MdomOBP2 均具有昆虫气味结合蛋白典型的保守序列和结构域，即具有 6 个保守的半胱氨酸位点（由于 MdomOBP1 为部分序列，所以只出现了 5 个 Cys，在其完整序列中应该会有全部 6 个 Cys），6 个半胱氨酸分别交叉形成 3 个二硫键，即 CysⅠ-CysⅢ，CysⅡ- CysⅤ，CysⅣ-CysⅥ，与气味结合蛋白二级结构的形成有关。从序列结构和生化特性来看，它们是较理想的家蝇气味结合蛋白候选基因。

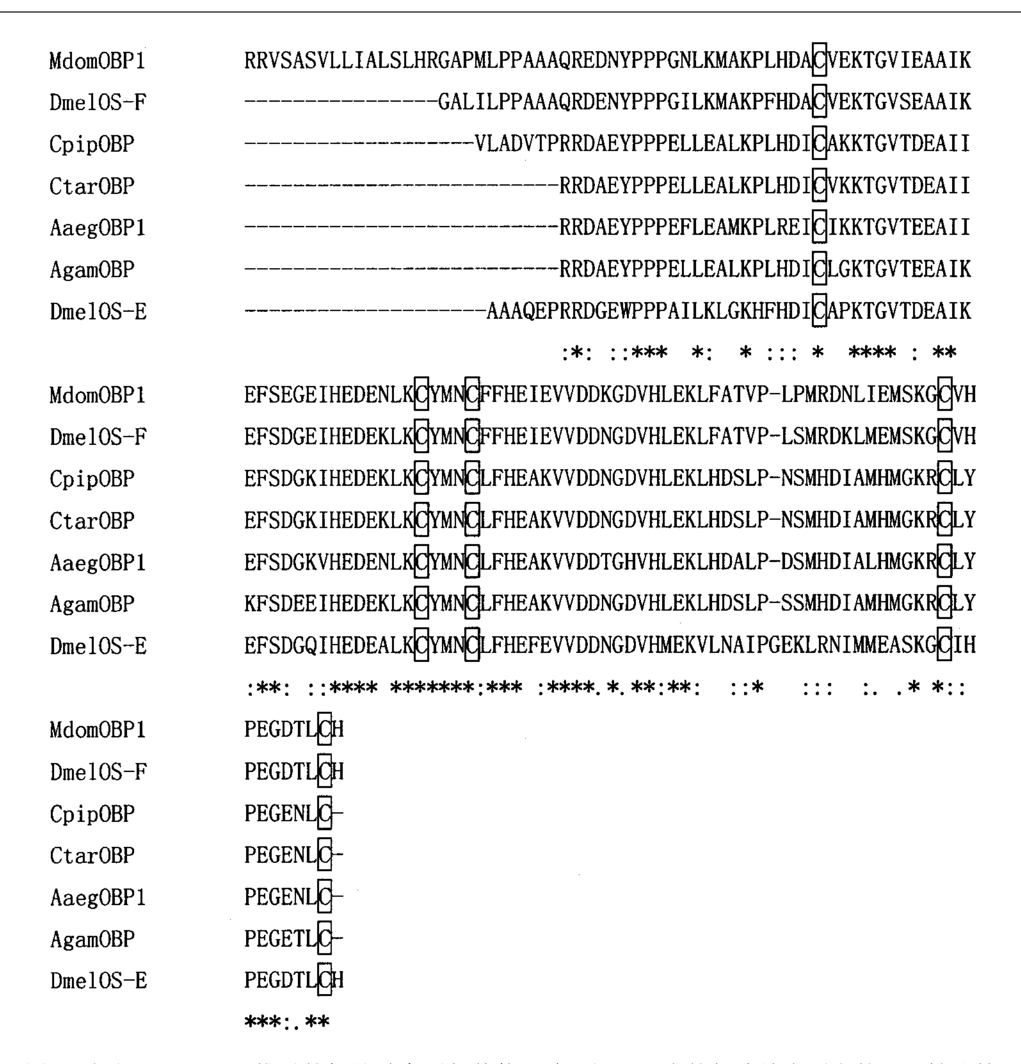


图 4　根据 MdomOBP1 推导的氨基酸序列与其他 6 种双翅目昆虫的气味结合蛋白的同源性比较

Fig. 4　Homologous analysis of deduced amino acid sequence from MdomOBP1 and corresponding sequences of the OBPs from Diptera
“ * ”代表与推导的气味结合蛋白序列相同的氨基酸“ * ”representing amino acid identical to that from MdomOBP1；“ : ”和“ . ”分别代表与气味结合蛋白序列相似的氨基酸“ : ” and “ . ” representing amino acid positive to that from MdomOBP1；方框表示保守的半胱氨酸位点 The amino acids in the brackets are the conservative Cys. MdomOBP1：家蝇 *Musca domestica* OBP1（AY730350）；MdomOBP2：家蝇 *M. domestica* OBP2（AY730351）；DmelOS-F：果蝇 *Drosophila melanogaster* odorant-binding protein OS-F（AAB51684）；DmelOS-E：果蝇 *D. melanogaster* odorant-binding protein OS-E（AAB51683）；CpipOBP：尖音库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* OBP（AAL86413）；CtarOBP：环喙库蚊 *Culex tarsalis* OBP（AAO73465）；AaegOBP1：埃及伊蚊 *Aedes aegypti* OBP（AAO74643）；AgamOBP：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（AAL84179）. 下同 The same below.

表 1　家蝇气味结合蛋白的 cDNA 片段及推导的氨基酸序列与双翅目昆虫 6 种气味结合蛋白的同源性（%）比较

Table 1　Homologous analysis（%）of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences from cloned OBP cDNA fragments in *Musca domestica* with the OBPs from Diptera

	MdomOBP1	MdomOBP2	DmelOS-F	DmelOS-E	CpipOBP	CtarOBP	AaegOBP1	AgamOBP
MdomOBP1		85	92	83	81	78	74	87
MdomOBP2	59		81	91	76	77	80	77
DmelOS-F	88	62		86	83	80	73	79
DmelOS-E	62	91	67		76	76	79	81
CpipOBP	57	58	61	64		91	79	86
CtarOBP	61	57	66	63	85		79	85
AaegOBP1	58	52	59	57	75	75		80
AgamOBP	62	56	67	62	77	77	82	

对角线以上数据为 cDNA 同源性，对角线以下为氨基酸同源性。The data above the diagonal is homology of cDNA，while the data below the diagonal is homology of its amino acids.

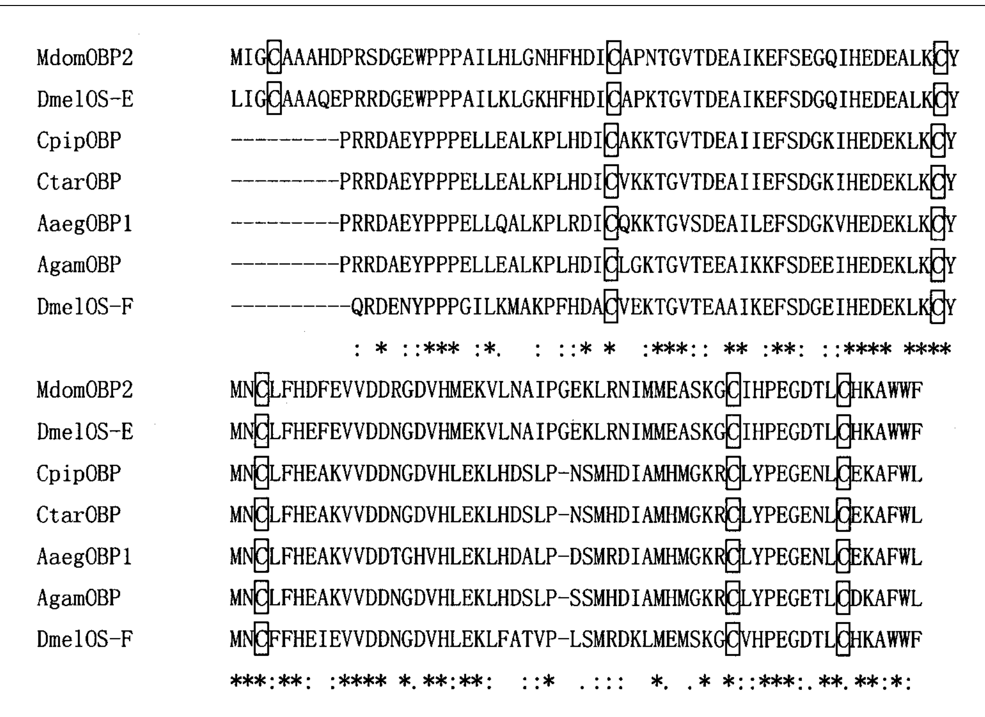


图 5 根据 MdomOBP2 推导的氨基酸序列与 6 种双翅目昆虫的气味结合蛋白的同源性比较

Fig. 5 Homologous analysis of deduced amino acid sequence from MdomOBP2 and corresponding sequences of the OBPs from Diptera

气味结合蛋白与脂溶性的气味分子发生作用，是昆虫专一识别外界气味分子的第一步生化反应，对昆虫与外界进行信息交流具有重要的意义。本实验克隆了 MdomOBP1 和 MdomOBP2 2 个气味结合蛋白的 cDNA 片段，在此基础上，作者今后将运用 RACE 方法克隆这 2 个气味结合蛋白基因的全长序列。而且，本实验室正在构建家蝇触角的 cDNA 文库，通过筛选文库也可能得到这 2 个基因的全长序列，甚至可以筛选得到更多的气味结合蛋白基因序列。作为本研究的后续工作，可以将该基因克隆到原核生物表达载体中，构建原核表达载体，然后在大肠杆菌中进行表达，以期获得足够的信息素结合蛋白用于生化特性和生理功能的研究，解决昆虫触角小、气味结合蛋白难于提取的问题。

致谢 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室郑用琏教授给予悉心的指导和无私帮助，张祖新博士和肖海林博士也对实验提出了很好的建议和指导，在此一并致以诚挚的谢意。

参考文献（References）

Breer H, Krieger J, Raming K, 1990. A novel class of binding proteins in the antennae of the silkmoth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochem.*, 20: 735–740.

Callahan FE, Vogt RG, Tucker ML, 2000. High level expression of "male specific" pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuiid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 507–514.

Du G, Prestwich GD, 1995. Protein structure encodes the ligand binding specificity in pheromone binding proteins. *Biochemistry*, 34: 8 726–8 732.

Ishida Y, Cornel AJ, Leal WS, 2002. Identification and cloning of a female antenna-specific odorant-binding protein in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Chem. Ecol.*, 28 (4): 867–871.

Lei CL, 1998. Using and Research of House Fly. Wuhan: Wuhan University Press. 1-10.［雷朝亮，1998. 家蝇的利用研究. 武汉：武汉大学出版社. 1–10］

Li ZX, Zhou JJ, 2004. Cloning, identification and expression profiling of the cDNAs of odorant-binding proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 417–423.［李正西，Jing-Jiang Zhou，2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报，47(4): 417–423］

Krieger J, Ganble H, Raming K, Breer H, 1993. Odorant binding proteins of *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23: 449–456.

Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111B: 503–514.

Seabrook WD, Linn CE, Dyer LJ, Shorey HH, 1987. Comparison of electroantennograms from female and male cabbage looper moths (*Trichoplusia ni*) of different ages and for various pheromone concentrations. *J. Chem. Ecol.*, 13: 1 443–1 453.

Steinbrecht RA, Ozaki M, Ziegelberger G, 1992. Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res.*, 270: 287–302.

Vogt RG, Lerner MR, 1989. Two groups of odorant binding proteins in insects suggest specific and general olfactory pathways. *Neurosci.*

Abstr.，15：1 290 – 1 296.

Vogt RG，Prestwich GD，Lerner MR，1991a. Odorant-binding protein subfamilies associated with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol*.，22：74 – 84.

Vogt RG，Riddiford LM，1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*，293：161 – 163.

Vogt RG，Rybczynski R，Lerner MR，1991b. Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*：comparison with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci*.，11：2 972 – 2 984.

Wang GR，Guo YY，Xu G，Wu KM，2001. Cloning and sequencing of a gene encoding GOBP2 in the antenna of *Spodoptera exigua*. *Scientia Agricultura Sinica*，34(6)：619 – 625.[王桂荣，郭予元，徐广，吴孔明，2001. 甜菜夜蛾 GOBP2 基因的克隆及序列测定. 中国农业科学，34(6)：619 – 625]

Zhou JJ，Zhang GA，Huang W，Birkett MA，Field LM，Pickett JA，Pelosi P，2004. Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*：evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Lett*.，558(1 – 3)：23 – 26.

（责任编辑：黄玲巧）